

THESIS

MARBURG

1966

Aus der Frauenklinik der Universität Marburg (Lahn)
Direktor: Professor Dr. med. R. Buchholz

Der Abbau verschiedener Steroide durch Lebergewebe unter dem Einfluß von Lost- und Aethylenimin-Verbindungen

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Medizin
der hohen Medizinischen Fakultät
der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Peter Diehls

aus Kassel

Marburg 1966

Fotodruck von Erich Mauersberger in Marburg

Aus der Frauenklinik der Universität Marburg (Lahn)
Direktor: Professor Dr. med. R. Buchholz

**Der Abbau verschiedener Steroide
durch Lebergewebe
unter dem Einfluß von Lost-
und Aethylenimin-Verbindungen**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Medizin
der hohen Medizinischen Fakultät
der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Peter Diehls

aus Kassel

Marburg 1966

Fotodruck von Erich Mauersberger in Marburg

Angenommen von der Medizinischen Fakultät
der Universität Marburg am 22. 2. 1966

gedruckt mit Genehmigung der Fakultät

Dekan: Prof. Dr. med. O. Braun-Falco

Referent: Prof. Dr. med. A. Würterle

Correferent: Prof. Dr. med. R. Buchholz

Meinen lieben Eltern
in Dankbarkeit gewidmet



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA40153507_0009

Inhaltsverzeichnis

Seite

Einleitung	1 - 5
Methodik	6 - 11
Ergebnisse	12 - 24
Diskussion	25 - 28
Zusammenfassung	29 - 30
Literaturverzeichnis	31

Der Abbau verschiedener Steroide durch Lebergewebe unter dem Einfluß von Lost- und Aethylenimin-Verbindungen.

Die älteste und wirksamste Methode der Krebsbehandlung ist wohl zweifellos die Operation. Dazu hat sich in diesem Jahrhundert die Strahlentherapie gesellt. Beide Methoden haben uns sicher gewisse Erfolge in der Behandlung bösartiger Geschwülste gebracht, aber da eine wesentliche Verbesserung dieser Ergebnisse vorerst nicht zu erwarten ist, versucht man heute in zunehmendem Maße, dem Krebs medikamentös beizukommen.

Gerade in der letzten Zeit wurden solche Substanzen gefunden, welche das Krebswachstum hemmen können. Im Vordergrund stehen bei Karzinomen und Sarkomen Lost- und Aethylenimin-Verbindungen. Ihre Wirksamkeit hat man rein empirisch entdeckt und sucht nun nach einer Möglichkeit der spezifischen Krebstherapie. Auf den Versuchen von Otto Warburg aufbauend ist man bemüht, die Chemotherapie des Krebses unter der Ausnutzung der Stoffwechseleigentümlichkeiten der malignen Zellen weiterzuentwickeln und durch Aufklärung der Wirkungsmechanismen der zunächst empirisch ermittelten Cytostatika, Möglichkeiten zu finden, direkt in den Stoffwechsel der Tumorzellen einzugreifen, um allein diesen zu blockieren.

Aus den bisher vorliegenden Untersuchungen ist zu entnehmen, daß durch Cytostatika besonders Atmung und Glykolyse beeinflußt werden. Nach LÖHR (1) sind in Endoxan-behandelten Tumoren gegenüber den Kontrollen fast alle glykolytischen Enzyme mehr oder weniger stark abgefallen, besonders die Phosphoglyceraldehyd-dehydrogenase und die Hexokinase. Auch bei den Metaboliten fand LÖHR einen 90 %igen Abfall des Totalgehaltes an oxydiertem DPN und eine 50 %ige Verminderung des reduzierten DPN. Der Laktat/Pyruvat-Quotient ging von 55 auf 18 zurück, wogegen die Fruktose-1/6-diphosphat-Konzentration um den Faktor 2,5 stieg. Bei den in vivo Versuchen an Tumorratten treten diese Effekte erst nach mehreren Tagen auf. Erst am dritten bis viertem Tag beobachtete HOLZER (2) an Endoxan-behandelten Ratten einen DPN-Abfall. Dies läßt nach Meinung zahlreicher Autoren auf eine langsame, nicht fermentative Umwandlung einer inaktiven Transportform des Endoxans in eine aktive Wirkform schließen, wobei an eine Ringspaltung des cyclischen N-Last-Phosphamidesters gedacht wird. (LÖHR, BROCK, WILLMANNS, ARNOLD und KLOSE) (3, 4 und 5).

Weiterhin ist auch sehr beachtenswert, daß z. B. die Atmung und Glykolyse von Hefezellen, von Ascitestumorzellen und auch von Schnitten normaler und maligner Gewebe durch Aethyleniminochinone (z. B. Trenimon) stark gehemmt werden, wogegen das cytostatisch sehr wirksame TEM nur einen ganz geringen Einfluß auf Atmung und Gärung ausübt. Durch Zusatz von Nikotinsäureamid läßt sich

die glykolysehemmende Wirkung der Aethyleniminochinone fast völlig aufheben, wogegen die Hemmung der Sauerstoffaufnahme nach Nikotinsäureamid-Zusatz fast unberührt bleibt.

Auch bei Berücksichtigung all dieser Befunde scheint der eigentliche Angriffspunkt der Cytostatika jedoch unklar zu sein. Wir müssen wohl durchaus verschiedene Angriffsmechanismen annehmen. Weiterhin kennen wir bisher kein tumorspezifisches Cytostatikum, so wie uns etwa die Möglichkeit gegeben ist, bei bestimmten Infektionskrankheiten in den Stoffwechsel der Erreger einzugreifen. Erwähnt sei in diesem Zusammenhang etwa das Prinzip der Sulfonamidtherapie, wobei für den übrigen Organismus im allgemeinen nur unbedeutende, durch die Chemotherapeutika bedingte Nebenwirkungen auftreten. Bei dem Einfluß der Cytostatika auf den Stoffwechsel maligner und normaler Gewebe muß man wohl mehr quantitative als qualitative Unterschiede annehmen.

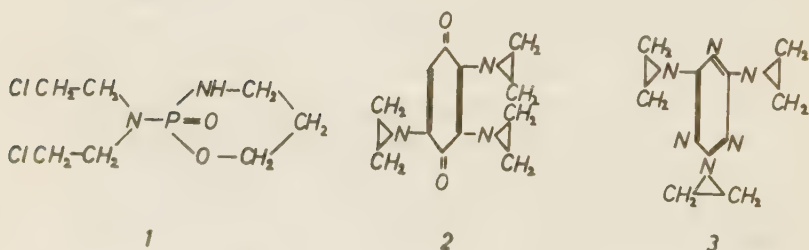
In der vorliegenden Arbeit dienten uns zur Feststellung einer möglichen Beeinflussung des Stoffwechsels der Leber durch Cytostatika der Östron-, Progesteron- und Cortisonabbau.

Soweit aus den über den Stoffwechsel der Östrogene bisher vorliegenden Angaben zu ersehen ist, lassen sich das Östradiol und das Östron in vielen tierischen Geweben leicht ineinander umwandeln. Die Umwandlungsfähigkeiten sind in den einzelnen Geweben recht unterschiedlich und abhängig von verschiedenen Enzymkonzentrationen, die sich nach DICZFALUSY (6) mehr in quantitativer als qualitativer Art unterscheiden. Die Autoren glauben, daß die tierische Leber mehr dem

Östradiol-Abbau diene, da sie die Dehydrierung der 17-Hydroxygruppe offenbar leichter vornehmen kann, als die Hydrierung der 17-Ketogruppe. RAKOFF, CANTAROW und PASCHKIS (7) konnten zeigen, daß die Umwandlung des Östradiols in Östron durch 17- β -Dehydrogenase DPN-abhängig ist.

Im Gegensatz zu dieser DPN-abhängigen Reaktion ist die Hydrierung der Doppelbindung im Ring A des Cortisons nach TOMKINS und ISSELBACHER (8) streng TPNH-abhängig. Nach SAMUELS (9) wirkt auch bei Progesteron ein Zusatz von DPN nicht beschleunigend auf die Reduktion der Δ^4 -3-Ketogruppe, was auch in diesem Falle auf eine TPNH-abhängige Reaktion hinweist.

Nach bisheriger Auffassung sieht man die Stoffwechselwirkung der Cytostatika in einer Beeinflussung DPN-abhängiger Reaktionen. Im folgenden werden wir die Stoffwechselwirkung von N, N-Bis-(β -



chlor-äthyl)-N, O-äthylen-phosphorsäureesterdiamid (Endoxan, Formel 1), Trisaethylenimonochinon (Trenimon, Formel 2) und Triaethylenmelanin (TEM, Formel 3)

an Leberschnitten normaler Ratten prüfen.

Wir werden auf quantitative Unterschiede in ihrer Beeinflussung des Stoffwechsels der Steroide achten, wollen aber besonders an Hand der erwähnten TPNH- und DPNH-abhängigen Reduktionen beobachten, ob qualitative Unterschiede in ihrer Wirkung bestehen.

Dabei stellen wir die TPNH-abhängigen Reaktionen, die Reduktion der Δ^4 -3-Ketogruppe des Cortisons und die Reduktion der Δ^4 -3-Ketogruppe des Progesterons der streng DPNH-abhängigen Reduktion des Östrons gegenüber, wobei uns diese definierten Stoffwechselschritte als Indikator für den Angriffspunkt der Cytostatika dienen sollen.

M E T H O D I K :

Als Versuchstiere dienten uns zu allen Versuchen männliche und weibliche Wistar- und E_3 -Haubenratten. Wir bezogen die Tiere aus dem Zentralinstitut für Versuchstierzucht in Hannover. Die Tiere erhielten bei uns Mischfutter und Wasser ad libitum. Zu Versuchszwecken wurden jeweils mehrere Tiere getötet. Wir ließen sie ausbluten und entnahmen ihnen durch einen weiten Bauchschnitt die Leber, die sofort in eiskalte KHR (Krebs-Hensleit-Ringerlösung) gebracht und dann mit der Rasierklinge in feine Schnitte zu 100 ± 2 mg zerlegt und eingewogen wurde. Die Leberschnitte zu 100 ± 2 mg wurden dann in vorbereitete Kölbchen überführt. Diese enthielten 1 ml KHR-Phosphat-Puffer-Gemisch. Durch Zugabe von Phosphat-Puffer wurde die KHR-Lösung auf einen p_H von 7,35 eingestellt. In dieser Krebs-Hensleit-Ringer-Puffer-Lösung war auch das entsprechende Cytostatikum enthalten, und zwar in einer Endkonzentration von 2×10^{-3} molar für Endoxan, 10^{-4} molar für TEM und Trenimon. Die Kölbchen, die enthielten nun die Leberschnitte und das entsprechende Cytostatikum in 1 ml KHR-Puffer-Lösung, wurden jetzt in einen Schüttelthermostaten bei einer Temperatur von $40^\circ C$ 3 Stunden vorinkubiert.

A. Nach Ablauf dieser Zeit wurden in jeden Ansatz der Versuchsreihe zum Cortisonstoffwechsel 2 ml einer KHR-Lösung, der Cortison aus einer aethanolischen Stammlösung, 100 mg Steroid pro ml, zugesetzt war, pipettiert.

Die Endkonzentration an Aethanol betrug bei der Lösung 5 %. Dann folgte eine 3-stündige Hauptinkubation, die allerdings in einigen Ansatzreihen verlängert wurde. Die weitere Aufarbeitung bestand in einer zweimaligen Extraktion der Ansätze mit jeweils 5 ml Chloroform p. a. Die schwerere Chloroformphase, in der sich die Ausgangsprodukte und die Metabolite gelöst befanden, wurden mittels Kapillare abgesaugt, und die entsprechenden Extrakte in einem Reagensglas vereinigt. Im Eindampfungsgerät wurden sie sodann bei Zimmertemperatur getrocknet. Die Rückstände wurden jeweils in 5 ml Aethanol gelöst und zu gleichen Mengen für die UV-Messung und die TTC-Reaktion verwendet. Mit der UV-Messung bei einer Wellenlänge von 241 m konnten wir den gesamten UV-Schwund ermitteln, der dem Umbau der Δ^4 -3-Ketogruppe des Ring A entspricht. Mit der TTC-Reaktion wiesen wir den Schwund der Seitenkette an C₁₇ nach. (Reaktion in Modifikation nach SCHRIEFERS und KORUS (10).

B. Die Vorbereitung der Ansätze für die Versuche über den Progesteronstoffwechsel erfolgte in ähnlicher Weise, wie bei den bereits geschilderten Cortisonstoffwechselversuchen. Die Leberschnitte zu 100 ± 2 mg wurden mit dem entsprechenden Cytostatikum 3 Stunden bei 40 °C vorinkubiert. Währenddessen wurden die Steroidansätze vorbereitet, in die dann die Leberschnitte und 1 ml Cytostatikum enthaltende KHR-Phosphat-Puffer-Lösung überführt wurden. Bei der Herstellung der Ansätze ergaben sich insofern Schwierigkeiten, als sich Progesteron nicht ohne weiteres in KHR

lösen ließ. Wir dampften daher unsere methanolische Steroid-Lösung 200 mg pro ml zunächst ein, lösten den Rückstand in 1 ml Äther und gaben 2 ml KHR-Lösung hinzu. Nach Abdampfen des Äthers war das Steroid nunmehr in der KHR fein suspendiert. In diese Suspension wurden jeweils die Leberschnitte mit dem vorinkubierten Cytostatikum überführt und für 3 Stunden inkubiert. Die weitere Aufarbeitung entspricht der beim Cortisonstoffwechsel beschriebenen: zweimalige Extraktion der Ansätze mit jeweils 5 ml Chloroform und Vereinigung der entsprechenden Extrakte in einem Sammelreagensglas.

Zur Orientierung über eine mögliche Beeinflussung des Progesteronabbaues durch Rattenleber bei Zusatz der erwähnten Cytostatika zu den jeweiligen Inkubationsmedien, wählten wir die Bestimmung der Δ^4 -3-Ketogruppe, die auf Grund ihrer Doppelbindung eine charakteristische UV-Absorption bei 241 m besitzt. Der Abbau unter normalen Bedingungen ohne Zusatz eines Cytostatikums wurde als Gesamt-UV-Schwund durch Vergleich mit der UV-Absorption der eingesetzten nicht inkubierten Menge ermittelt, und gleich 100 % gesetzt. Die ein Cytostatikum enthaltenden Ansätze wurden dann auf die Umsatzgröße bezogen. Die molare Konzentration war in allen Ansätzen für Endoxan 2×10^{-3} , für Trenimon 10^{-4} . Versuche mit TEM wurden nicht durchgeführt.

C. Zur Beurteilung des Österonabbaues unter den erwähnten Bedingungen wählten wir gleichartige Ansatzreihen, wobei außer Endoxan und Trenimon auch TEM verwendet wurde. Die Herstellung der Ansatz-

reihen entspricht der für den Progesteronabbau geschilderten bis auf eine Abweichung: die eigentliche Inkubationsdauer beträgt nur eine Stunde. Die Weiterverarbeitung der bei diesen Versuchen jeweils dreifach vorhandenen Ansätze bestand in einer Lösung der Chloroformrückstände in je 5 ml Methanol. Von diesen wurden jeweils 2 ml in ein Sammelreagensglas überführt und nach Eindampfen die Rückstände wieder in 10 ml Methanol gelöst. 1 ml wurde zur Bestimmung des Östronschwundes weiterverarbeitet. Diesen ermittelten wir durch Trennung der Substanzen an Aluminiumoxyd nach ITTRICH (11). Den Rest des jeweils eingesetzten Hormons bestimmten wir nach einer von ITTRICH angegebenen Farbreaktion. Der Abbau unter normalen Bedingungen ohne Zusatz eines Cytostatikums wurde wiederum gleich 100 % und in Vergleich zu der nicht inkubierten Ausgangsmenge gesetzt. Auf diese Umsatzgröße wurden die ein Cytostatikum enthaltenden Ansätze bezogen.

Zur Herstellung der Aluminiumoxydsäulen verwendeten wir Aluminiumoxyd nach Brockmann (E. Merck), das durch Zusatz von 5 % aqua bidest deaktiviert war. Mit Benzol bidest wurden jeweils 3 g Al_2O_3 pro Säule eingeschwemmt. Sodann wurde unser Substanzgemisch, das in 2 ml Benzol und der gleichen Menge Petroläther gelöst war, vorsichtig auf die Oxydschicht gegeben, wenn gerade noch diese von einem dünnen Benzolspiegel vom Einschwemmen bedeckt war. War auch dieses Benzol-Petroläther-Gemisch mit den gelösten Substanzen soweit durchgelaufen, und damit das Hormon am Oxyd adsorbiert, dann eluierten wir mit 20 ml 0,8 %igen Äthanol in Benzol. Das Eluat

wurde eingedampft, der Rückstand in 5 ml Äthanol aufgenommen und aliquote Mengen für die UV-Messung und zur Farbreaktion weiterverwendet.

In zahlreichen Vorversuchen beschäftigten wir uns mit der Trennfähigkeit der Aluminiumoxydsäule nach ITTRICH. Es bestand nämlich die Möglichkeit, daß zum Teil Östron zu Östradiol abgebaut wird. In unseren Vorversuchen verwendeten wir die oben angegebene Menge Al_2O_3 und trugen dann gleiche Mengen von einer Östron- und Östradiol-Stammlösung auf die Säule auf. Durch Veränderung der Äthanolkonzentration in Benzol war es möglich, die Hormone gut voneinander zu trennen. Im Einzelnen war zum Eluieren von Östron eine 0,8 %ige und zum Eluieren von Östradiol eine 3 %ige Äthanol-Benzolmischung erforderlich. Auf Grund dieser Ergebnisse hatten wir die Sicherheit, aus dem Substanzgemisch nur das Östron zu eluieren, dessen Menge durch die von ITTRICH angegebene Farbreaktion bestimmt wurde.

Die Farbreaktion besteht darin, daß der übliche Kober-Farbkomplex mit 2 % p-Nitrophenol in Chloroform selektiv extrahiert wird und wegen seiner intensiven, wenn auch labilen Färbung, den Nachweis selbst kleiner Hormonmengen gestattet. Man mißt die Absorption bei 577, 538,5 und bei 500 m. Nach einer Korrekturformel

$$E_{\text{korr.}} = E_{538,5} - \frac{E_{500} + E_{577}}{2}$$
 errechnet man die korrigierte Extinktion (Allen-Korrektur) und vergleicht die gefundenen Werte mit den Extinktionen der entsprechenden Eichkurve. An Reagentien brauchten wir eine 2 % ige Nitrophenol-Chloroform-Lösung, eine 64 %ige Hydrochinon-

Salzsäure-Lösung und Aqua bidest. Zeitgerecht wurden diese in die Ansätze pipettiert und 40 Minuten gekocht. Die Ansätze wurden nach dieser Zeit in Eiswasser gekühlt und der in der abzentrifugierten Chloroformphase enthaltene Farbkomplex gemessen.

Zu den Tabellen und ihren Ergebnissen ist festzustellen, daß die Größe der Streuung und die Genauigkeit der Mittelwerte nach den Gesetzen der sogenannten Normalverteilung nach Gauss-Laplace berechnet wurden.

A. In unseren Versuchen zeigte sich nach 3-stündiger Vorinkubation mit Endoxan und Trenimon und gleichlanger Hauptinkubation, daß der Abbau des Cortisons gegenüber Kontrollen ohne Cytostatikum deutlich gehemmt ist. (Tab. 1).

UV-Schwund		Schwund der Seitenkette		
N	E	N	E	
91	60	39	26	
69	34	29	21	
75	35	29	13	
80	67	35	26	
72	47	58	22	
32	25	34	25	
70	66	45	41	
54	48	42	35	
56	47	46	34	
55	50	52	46	
56	48	45	28	
39	30	33	25	
81	72	34	30	
Mittel-				
werte	63,8 $\pm$ 17,3	48,4 $\pm$ 14,6	40,0 $\pm$ 8,8	28,6 $\pm$ 8,4
entspr.	100 %	75,8 %	100 %	71,5 %
Hemmung		24,2 %		28,5 %

Tab. 1 Cortisonstoffwechsel in Rattenleberschnitten unter Normalbedingungen (N); bei Zusatz von Endoxan gemessen am UV-Schwund (Schwund der Δ^4 -3-Ketogruppe und am Schwund der Seitenkette (TTC-Reaktion).

UV-SCHWUND		SCHWUND der SEITENKETTE		
N	T	N	T	
70	50	45	31	
54	37	42	28	
56	27	46	12	
55	44	52	29	
56	14	45	8	
39	6	33	5	
81	24	34	19	
Mittel-				
werte	58,7 $\pm$ 13	27,4 $\pm$ 6,1	42,4 $\pm$ 7,5	19 $\pm$ 10,5
entspr.	100 %	46,6 %	100 %	47,2 %
Hemmung		53,4 %		52,8 %

Tab. 1 Cortisonstoffwechsel in Rattenleberschnitten unter Normalbedingungen (N); bei Zusatz von Trenimon, gemessen am UV-Schwund (Schwund der Δ^4 -3-Ketogruppe und am Schwund der Seitenkette (TTC-Reaktion). Die Größe der Streuung und die Genauigkeit der Mittelwerte wurde nach den Gesetzen der sogen. Normalverteilung nach Gauss-Laplace berechnet.

Diese Kontrollen entsprechen in unseren Versuchen dem normalen Cortisonabbau durch Rattenleber. Sie werden im folgenden als Bezugswert mit 100 % angegeben. Bei jeder Versuchsreihe wurde dieser Wert neu bestimmt. Wir fanden bei unseren Untersuchungen, daß der absolute Cortisonabbau ohne Cytostatikum-Zusatz bis zu 91 % der zugesetzten Cortisonmenge betrug. Er war allerdings abhängig von der jeweiligen Inkubationsdauer, die wir zwischen 1 und 3 Stunden wählten, und bei den einzelnen Tieren zum Teil

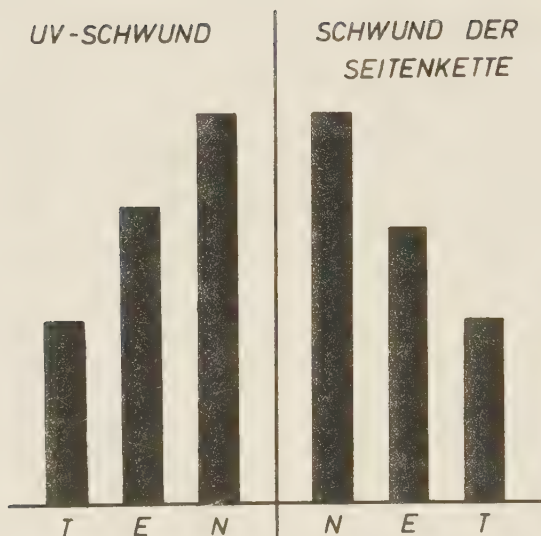


Abb. 2 Graphische Darstellung der Tabelle 1. (Der UV-Schwund entspricht dem Umbau der Δ^4 -3-Ketogruppe im Ring A. Siehe Text).

recht unterschiedlich. An dieser Stelle sei bemerkt, daß der tatsächliche Schwund an unverändertem Cortison weitaus größer ist, als man nach der UV-Absorption erwarten sollte. Durch papierchromatographische Auftrennung der Cortison-Stoffwechselprodukte läßt sich nämlich feststellen, daß die Gesamt-UV-Absorption sowohl auf unverändertes Cortison wie auch auf UV-positive Metabolite zurückgeht.

Auf eine nochmalige Identifizierung dieser schon bekannten Abbauprodukte haben wir verzichtet und sind der Meinung, daß bei unseren Untersuchungen zum Vergleich einzelner Stoffwechselgrößen unter variierendem Inkubationsbedingungen die Erfassung des Gesamt-UV-Schwundes als ausreichend anzusehen ist.

Bei den Ansätzen mit Zusatz eines Cytostatikums fanden wir eine Hemmung des Abbaues im Ring A (UV-Absorption), die etwa der Hemmung des Seitenkettenabbaues entspricht (Abb. 2). Für Endoxan läßt sich sagen, daß der Abbau im Ring A im Mittel 76 %, für die Seitenkette 71,5 % des Normalabbaues im Mittel ausmacht. Der Abbau unter Trenimon-zusatz, in etwa 1/20 der Endoxankonzentration, beträgt 47 % für Ring A und die Seitenkette. Diese eben beschriebene Abbauehemmung konnten wir nicht in allen Versuchen nachweisen, und zwar dann nicht, wenn den Leberschnitten gleichzeitig Cytostatikum und Cortison zugesetzt wurde. Dies gilt besonders für den Ring A. Die Hemmung tritt also nur dann auf, wenn die Leberschnitte mit dem cytostatikumhaltigen KHR-Phosphat-Puffer vorinkubiert waren.

Auf Grund dieser Beobachtung könnte man in Erwägung ziehen, daß während der Vorinkubation die Leber auf irgendeine Art und Weise geschädigt wird, oder daß eine Aktivierung des Cytostatikums erfolgt.

Auf Grund dieser Befunde und der viel diskutierten Frage einer inaktiven Transport- und aktiven Wirkform des Endoxans

haben wir dieses Cytostatikum daraufhin untersucht.

Wir sind folgendermaßen vorgegangen, um eine bei der Inkubation doch mögliche Leberschädigung nachzuweisen oder auszuschließen: Leberschnitte von 100 ± 2 mg Gewicht wurden in einem endoxanhaltigen KHR-Phosphat-Puffer 3 Stunden vorinkubiert und dann vom Inkubationsmedium getrennt. Anschließend wurden sie dreimal in endoxanfreier KHR ausgewaschen, um das Cytostatikum restlos herauszuspülen. Nun wurde diesen Leberschnitten in der oben beschriebenen Form Cortison zugesetzt. Es erfolgte eine 3-stündige Inkubation, und dann ein photometrischer Vergleich mit entsprechenden Bezugswerten. Dabei zeigte sich zwar ein etwas geringerer Cortisonabbau bei den "gewaschenen" Leberschnitten, der aber im Vergleich mit Normalwerten unbedeutend war und wohl auf eine geringe Retention von Endoxan im Lebergewebe zurückzuführen ist. Demnach war eine nachhaltige Leberschädigung wohl nicht nachzuweisen. Wie bereits erwähnt, sieht man die Aktivierung des Endoxans in einer nicht fermentativen Chlorionenhydrolyse oder einer hydrolytischen Ringspaltung an der Phosphamidbindung. Daher haben wir Endoxan unter verschiedenen Zeit-Temperatur- und p_H -Bedingungen hydrolysiert. Eine direkte Hemmung des Cortisonabbaues konnten wir auch jetzt ohne Vorinkubation in keinem Falle nachweisen.

In weiteren Versuchen konnten wir zeigen, daß mit zunehmender Vorinkubationsdauer des Endoxans mit Leberschnitten die Abbauehemmung sowohl für den Ring A, als auch für die Seitenkette zunimmt. (Abb. 3)

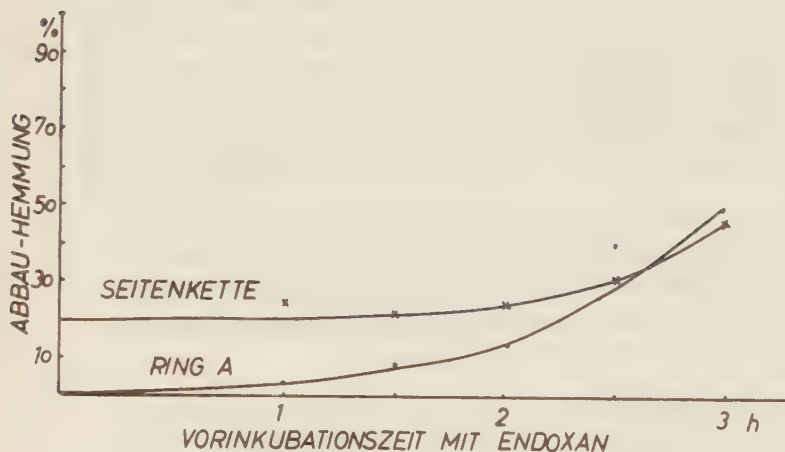


Abb. 3 Hemmung des Cortisonabbau in Abhängigkeit von der Vorinkubationszeit des Endoxans mit Leber. Die einzelnen Meßpunkte entsprechen den Mittelwerten aus 3 Einzelbestimmungen.

In diesem Zusammenhang muß noch angeführt werden, daß wir bei Direktinkubation des Cortisons mit Endoxan für den Ring A nie, für die Seitenkette eine geringe Abbauhemmung nachweisen konnten.

In unseren weiteren Versuchen wurde nun die Wirkung des Endoxans in der erwähnten Konzentration bei Vorinkubation mit Leberschnitten bis zu 6 Stunden an frischen Leberschnitten geprüft. Wir sind folgendermaßen vorgegangen:

Versuchstieren wurden zur Zeit 0 nach 3 und 6 Stunden Proben aus dem oben genannten Vorinkubationsmedium zugesetzt, und deren Einfluß auf den Cortisonstoffwechsel geprüft. Wie aus der Beschreibung hervorgeht, erfolgte in einigen Fällen der Zusatz des Cortisonä direkt, d. h. Cortison, vorinkubiertes Endoxan und frische Leberschnitte wurden zu gleicher Zeit inkubiert; in anderen Fällen wurden die Leberschnitte erst 3 Stunden mit dem vorher zu verschiedenen Zeiten entnommenen Vorinkubationsmedium vorinkubiert, und dann erfolgte der Cortisonzusatz.

Im Falle des Direktzusatzes (Cortison, Vorinkubationsmedium und Leberschnitte wurden zu gleicher Zeit inkubiert) fanden wir eine deutliche Hemmung des Cortisonstoffwechsels, und zwar eine Abbauphemmung des Ringes A von 7 %, für die Seitenkette eine solche von 21 %.

Die Abbauphemmung wurde allerdings noch gesteigert durch eine 3-stündige Vorinkubation der Leberschnitte mit dem oben genannten Vorinkubationsmedium und in Abhängigkeit davon, wie lange das verwendete Vorinkubationsmedium im Vorversuch mit den Leberschnitten vorinkubiert wurde. (Abb. 4)

In weiteren Versuchen prüften wir die Cortisonabbauphemmung des Endoxans und des Trenimons unter Zusatz von Nikotinsäureamid in verschiedener Konzentration. Letzteres soll, wie in der Literatur erwähnt wird, den DPN-Abfall bei Behandlung mit Cyto-

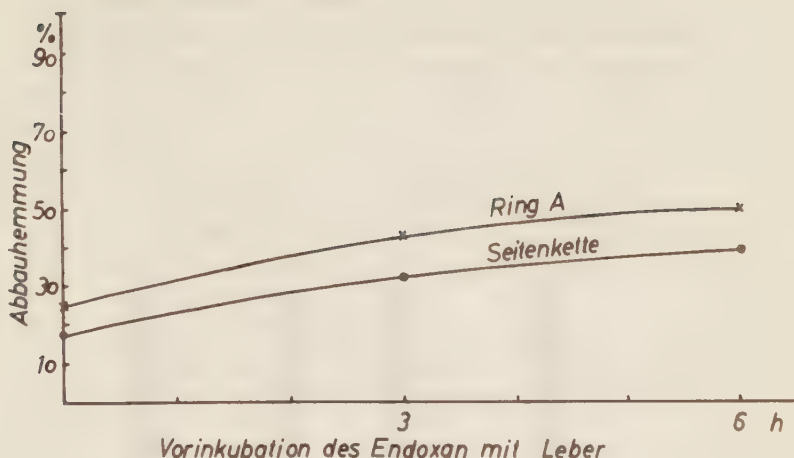


Abb. 4 Endoxanaktivierung in Abhängigkeit von der Dauer der Vorinkubation mit Leber, gemessen an der Cortisonabbauhemmung. Die Meßpunkte entsprechen den Mittelwerten aus 3 Einzelbestimmungen.

statika nahezu aufheben. Wir fanden, daß die Cortisonabbauhemmung durch Endoxan und Trenimon unter Nikotinsäureamidzusatz auch in hohen Konzentrationen nicht beeinflußt wurde.

Außerdem verglichen wir die Wirkung von Trenimon und TEM auf den Cortisonstoffwechsel. Wie bereits erwähnt hat TEM auf Atmung und Glykolyse im Gegensatz zu Trenimon und Endoxan nur einen geringen Einfluß. Die Abbildung 5 macht uns den Unterschied deutlich. Während Trenimon stark wirksam war, sowohl beim Abbau des Ringes

A, als auch beim Seitenkettenabbau, können wir unter TEM-Einfluß keine Hemmung im Abbau des Ringes A und der Seitenkette nachweisen.

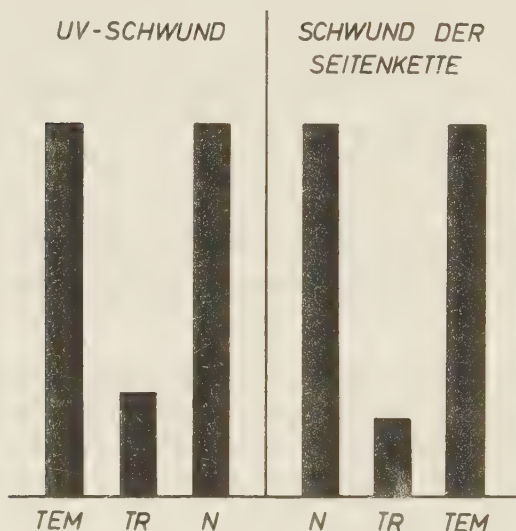


Abb. 5. Cortisonabbau durch Rattenleberschnitte ohne Zusatz eines Cytostatikums (N), bei Zusatz von Trenimon (Tr) und TEM, gemessen am Umbau des Ringes A und am Schwund der Seitenkette.

B. Bezugnehmend auf die Erfahrungen mit Endoxan beim Cortisonstoffwechsel (siehe Abb. 3), daß nämlich mit zunehmender Inkubationsdauer mit Leberschnitten eine steigende Aktivierung des Endoxans eintritt, haben wir im folgenden zu den Versuchen am Progesteronstoffwechsel die Leberschnitte jeweils 3 Stunden in der beschriebenen Weise vorinkubiert, und erst dann in den entsprechenden Steroidansatz überführt. Bei den nachstehenden Versuchsergebnissen ist also der eigentlichen Inkubation in jedem Falle eine 3-stündige Vorinkubation vorausgegangen.

%Schwund der Δ^4 -3-Ketogruppe			
Tier	Normal	Endoxan	Trenimon
1	70	56	36
2	70	59	39
3	54	43	38
4	68	58	36
5	59	39	36
6	39	27	29
Mittel-			
werte	60 $\pm$ 12,2	47 $\pm$ 13,2	36 $\pm$ 12,2
entspr.	100 %	78 %	60 %
Hemmung		22 %	40 %

Tab. 2 Progesteronabbau durch Rattenleberschnitte ohne Zusatz eines Cytostatikums (Normal), bei Zusatz von Endoxan und Trenimon, gemessen am Schwund der Δ^4 -3-Ketogruppe. Nach 3-stündiger Inkubation betrug der absolute Abbau im

Mittel 60 %. Bei Endoxan- und Trenimon-Zusatz fanden wir eine Hemmung des Abbaues. Sie betrug für Endoxan 47 %, für Trenimon 36 %. Wenn man den Progesteronabbau unter Normalbedingungen gleich 100 % setzt, so ergibt sich unter Einfluß von Endoxan eine Abbauhemmung von 22 %, für Trenimon eine solche von 40 %. (Tab. 2 und Abb. 6)

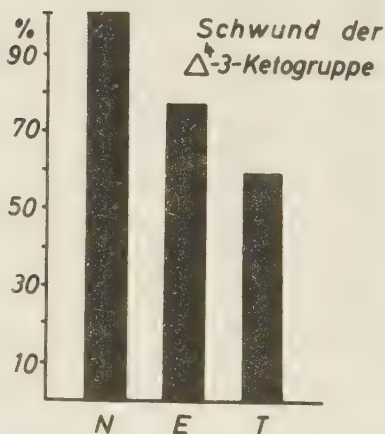


Abb. 6 Graphische Darstellung der Tabelle 2.

C. Nach einer einstündigen Inkubation von Östron, der eine 3-stündige Vorinkubation der Leberschnitte mit dem jeweiligen Cytostatikum aus erwähnten Gründen vorausgegangen war betrug der Abbau im Mittel 38 %. Bei Zusatz

von Endoxan und von Trenimon war er geringfügig gehemmt und machte für Endoxan 35 %, für Trenimon 32 % aus.

Prozentualer Östron-Abbau bei Zusatz von				
Tier	Normal	Endoxan	Trenimon	TEM
1	34	31	17	37
2	24	22	20	24
3	27	27	26	27
4	50	45	44	58
5	48	46	45	48
6	23	17	19	29
7	20	21	20	25
8	50	46	43	50
9	44	42	40	44
10	61	55	51	67
Mittel-				
werte	38,1 $\pm$ 14,1	35,2 $\pm$ 13,1	32,5 $\pm$ 13,1	40,9 $\pm$ 14,9
entspr.	100 %	92,3 %	85 %	106 %
Hemmung		7,7 %	15 %	6 %

Tab. 3 Östronabbau durch Rattenleberschnitte ohne Zusatz eines Cytostatikums (Normal), bei Zusatz von Endoxan, TEM und Trenimon.

Bei den untersuchten Tieren zeigte sich bei 2 von 10 Tieren überhaupt keine Abbauehemmung. TEM blieb bei 5 Tieren ohne Wirkung auf den Östronabbau, dagegen war bei 5 Tieren der Abbau

deutlich gesteigert. Wenn man den Östronabbau unter Normalbedingungen gleich 100 % setzt, so ergibt sich unter Endoxan-Einfluß eine Abbauehemmung von 7,7 %, unter Trenimon-Einfluß eine solche von 15 %, wogegen TEM bei Berücksichtigung der an allen Tieren gewonnenen Ergebnisse eine geringe Aktivierung von 6 % bewirkt.

DISKUSSION :

Eine Hemmung im Steroidabbau durch Lebergewebe tritt in der Mehrzahl der Fälle nur dann ein, wenn die Leberschnitte in dem das Cytostatikum enthaltenden Puffer (p_H 7,3) vorinkubiert werden. Eine Hemmung für den Abbau des Ringes A des Cortisons, und so gut wie keine für die Seitenkette ließen sich nicht beobachten, wenn Cytostatikum und Steroid gleichzeitig den Leberschnitten zugesetzt wurden.

Setzt man den Steroidabbau unter Normalbedingungen gleich 100 %, so finden wir unter Cytostatikum-Einfluß für die untersuchten Steroide eine recht unterschiedliche Hemmung in ihrem Abbau.

Für den Cortisonabbau ergab sich im Mittel eine Hemmung von 53 % unter Trenimon-Einfluß und eine von etwa 25 % unter Endoxan-Einfluß. Auch der Abbau der ketolischen Seitenkette war in etwa im gleichen Maße gehemmt. Beim Progesteronabbau fanden wir unter dem Einfluß dieser Cytostatika eine geringere Hemmung. Sie betrug für Trenimon 40 % und für Endoxan 22 %. Im Gegensatz dazu konnten wir feststellen, daß sich unter Endoxan-Einfluß für den Abbau des Östrons eine mittlere Hemmung von nur 7,7 %, unter Trenimon-Einfluß eine solche von 15 % nachweisen läßt. TEM bewirkte beim Östronabbau sogar eine geringe Aktivierung von 6 %. Bei den Versuchen zum Cortisonstoffwechsel zeigte dieses Cytostatikum überhaupt keine Wirkung.

Wie eingangs erwähnt, sieht man die Wirkung der Cytostatika vornehmlich in einer Beeinflussung DPN-abhängiger Reaktionen.

In unseren Versuchen haben wir 2 TPNH-abhängige Reduktionen einer DPNH-abhängigen gegenübergestellt. Dabei zeigte sich, daß die TPNH-abhängige Reduktion der Δ^4 -3-Ketogruppe des Cortisons stark und die gleichfalls TPNH-abhängige Reduktion der Δ^4 -3-Ketogruppe des Progesterons stärker gehemmt werden, als die DPNH-abhängige Reduktion der 17-Ketogruppe des Östrons, die nur geringfügig gehemmt wird. Im Gegensatz zu der vertretenen Ansicht zeigen unsere Versuchsergebnisse eine besonders bevorzugte Hemmung TPNH-abhängiger Reduktionen. Das im Gegensatz zu diesen Cytostatika, Atmung und Glykolyse nur wenig beeinflussende TEM, erwies sich in den von uns untersuchten DPNH- und TPNH-abhängigen Reduktionen als wirkungslos.

Die Cortisonabbauhemmung unter Endoxan- und Trenimon-Einfluß ließ sich durch Zusatz von Nikotinsäureamid in verschiedenen Konzentrationen nicht beeinflussen. Letzteres soll, wie in der Literatur erwähnt wird, den DPN-Abfall bei Behandlung mit Cytostatika nahezu aufheben. Auch dieser Befund spricht also dafür, daß die bei unserer Versuchsanordnung geprüften Stoffwechselschritte TPNH- und nicht DPNH-abhängig sind.

Im Hinblick auf die beim Endoxan viel diskutierte Frage einer inaktiven Transport- und aktiven Wirkform haben wir dieses Cytostatikum genauer untersucht. Nach einfacher Hydrolyse unter verschiedenen Zeit-, Temperatur- und p_H -Bedingungen ließ sich eine direkte Hemmung des Cortisonabbaues nicht nachweisen. Nur nach Vorinkubation mit Leberschnitten war dies möglich. Auch eine mögliche

Leberschädigung wurde in unseren Versuchen ausgeschlossen. Wenn man aber eine enzymatische Aktivierung annimmt, dann wäre von einer solchen zu erwarten,

1. daß sie mit zunehmender Inkubationsdauer anstiege;
2. daß ein einmal aktiviertes Cytostatikum ohne erneute Vorinkubation den Cortisonabbau durch Lebergewebe hemmen würde.

Diese Vermutung ließ sich durch unsere Versuche bestätigen. (Abb. 3 und Abb. 4).

Am Cortisonstoffwechsel gemessen, scheint Endoxan nach unseren Versuchsergebnissen keine nachhaltige Leberschädigung zu setzen. Daraus kann man mit einiger Sicherheit annehmen, daß es nur zur Zeit seiner Anwesenheit wirkt. Hier ergibt sich eine Parallele zum Butazolidin, das nach LUTZMANN und DIRSCHERL (12) den Cortisonstoffwechsel auch nur zur Zeit seiner Anwesenheit hemmt. Einige Autoren sehen die antirheumatische Wirkung des Butazolidins in einer teilweisen Hemmung des Cortisonabbaues. (LUTZMANN und DIRSCHERL) (13), (KERSTEN, STAUDINGER) (14) und (KORUS, SCHRIEFERS u. DIRSCHERL) (15).

Diese Hemmung ist nach STAUDINGER weder durch DPN- noch durch Nikotinsäureamid- U satz beeinflussbar. Seiner Meinung nach hemmt das Butazolidin das TPNH-abhängige wasserstoffübertragende Enzym. Nach ISSELBACHER und TOMKINS ist die Hydrierung im Ring A des Cortison streng TPNH-abhängig.

In der Tatsache, daß die Cortisonabbauhemmung durch Endoxan und Trenimon selbst durch hohe Konzentrationen von Nikotinsäureamid nicht beeinflußt wird, haben wir eine weitere Parallele zum Butazolidin. Auf Grund ihres ähnlichen Verhaltens können wir für diese Cytostatika nun umso mehr mit einer Hemmung TPN-abhängiger Reaktionen rechnen, als unsere vorher diskutierten Ergebnisse diese Annahme schon sehr wahrscheinlich machten.

Die vorher geschilderten Versuchsergebnisse zeigen, daß einmal für verschiedene Cytostatika durchaus verschiedene Angriffspunkte angenommen werden müssen. Zum anderen ist ihre Wirkung nicht tumorspezifisch. Es muß damit gerechnet werden, daß in der Beeinflussung normaler und maligner Gewebe mehr quantitative als qualitative Unterschiede bestehen, die sich besonders in stoffwechselaktiven Geweben auswirken werden.

Z U S A M M E N F A S S U N G :

Am Cortison-, Progesteron- und Östron-Stoffwechsel der Rattenleberschnitte wird der Einfluß verschiedener Cytostatika (Endoxan, Trenimon und TEM) geprüft. Der Cortison- und Progesteron-Abbau wird durch Endoxan und Trenimon wesentlich stärker gehemmt, als der Östron-Abbau.

TEM zeigte bei unseren Versuchen am Cortison- und Östron-Stoffwechsel keine Wirkung.

Durch Nikotinsäureamid-Zusatz ließ sich die Hemmung des Cortison-Abbaues unter Cytostatikum-Einfluß nicht aufheben. Die Wirkung der Cytostatika wird in einer unterschiedlichen Beeinflussung DPNH- und TPNH-abhängiger Reduktionen gesehen. Endoxan und Trenimon hemmen in hohem Maße die TPNH-abhängige Reduktion der Δ^4 -3-Ketogruppe des Cortisons sowie die ebenfalls TPNH-abhängige Reduktion der Δ^4 -3-Ketogruppe des Progesterons.

Die DPNH-abhängige Reduktion der 17-Ketogruppe des Östrons wird dagegen nur wenig gehemmt. Das im Gegensatz zu Endoxan und Trenimon Atmung und Gärung nur wenig beeinflussende TEM erwies sich auch in den von uns untersuchten DPN- und TPN-abhängigen Reaktionen als wirkungslos.

Mit großer Wahrscheinlichkeit wird die inaktive Transportform des Endoxans durch Lebergewebe enzymatisch aktiviert. Es scheint nur für die Zeit seiner Abwesenheit zu wirken.

Parallelen zur Butanzolidinwirkung auf den Cortisonstoffwechsel werden besprochen.

Für verschiedene Cytostatika müssen verschiedene Angriffspunkte angenommen werden. Man muß quantitative und qualitative Unterschiede in ihrer Beeinflussung normaler und maligner Gewebe annehmen, die sich besonders in stoffwechselaktiven Geweben auswirken werden.

LITERATURVERZEICHNIS:

1. LÖHR, G. W.: Chemotherapie maligner Tumoren,
2. Bielefelder Symposion (1959)
2. HOLZER, H. und KRÖGER, H.: Zum Mechanismus der
Wirkung von B 518 (Endoxan-Asta)
auf das Jensen-Sarkom und zur Hemmung
der Chemotherapie von Tumoren durch das
Vitamin Nicotinsäureamid,
Kli. Wo. 36, 677-678 (1958).
3. BROCK, N. und WILMANNS, H.: Wirkung eines zyklischen
N-Lost-Phosphamidesters auf experimentell
erzeugte Tumoren der Ratte,
D.med. Wochenschrift 83, 453 (1958).
4. BROCK, N.: Zur pharmakologischen Charakterisierung
zyklischer N-Lost-Phosphamidester als Krebs-
Chemotherapeutika,
Arzneim.-Forsch. 8, 1-9 (1958).
5. ARNOLD, H. und KLOSE, H.: Die Hydrolyse hexacyclischer
N-Lostphosphamidester im gepufferten System,
Arzneim.-Forsch. 10, 288-291 (1960).
6. DICZFALUSY, E. und LAURITZEN, Ch.: Östrogene beim Menschen,
Springer-Verlag (1961).
7. RAKOFF, A. E., CANTAROW und PASCHKIS, K.E.:
Mechanism of inactivation of L-Estradiol by
rat liver "in vitro",
Endocrinology 43, 97-104 (1948).
8. THOMKINS, G. und ISSELBACHER, K. J.: Enzymatic Reduction of
Cortisone
Journ. Amer. Chem. Soc. 76, 3100 - 3101 (1954).

9. SAMUELS, L. T.: The metabolism of Androgens by Tissnes,
Recent Progr. Hormone Res. 4, 65 - 83 (1949).
10. SCHRIEFERS, H. und KORUS, W.: Zur Bestimmung von Corticoiden
mit Triphenyltetrazoliumchlorid (TTC),
Naturwissensch. 43, 517-518 (1956).
11. ITTRICH, G.: Eine neue Methode zur chemischen Bestimmung
der östrogenen Hormone im Harn,
Hoppe-Seyler's Z. physiolog. Chem. 312, 1-14
(1958).
12. LUTZMANN, L. und DIRSCHERL, W.: Cortisoninaktivierung in der
Rattenleber nach Injektion von Butazolidin,
Acta endocrin. 34, 77-83 (1960).
13. LUTZMANN, L. und DIRSCHERL, W.: Einfluß verschiedener Antirheu-
matica auf den Stoffwechsel des Cortisons in der
Rattenleber,
Arzneim.-Forsch. 9, 659-660 (1959).
14. KERSTEN, H. und STAUDINGER, H. J.: Der Einfluß von Butazolidin
auf die Cortisoninaktivierung in Leberhomoge-
naten, Kli. Wo. 34, 523-525 (1956).
15. KORUS, W., SCHRIEFERS, H. und DIRSCHERL, W.: Über den Stoff-
wechsel des Cortisons in der Rattenleber
unter dem Einfluß von 3,5-Dioxo-1,2-diphenyl-
4n-butyl-pyrazolidin (Butazolidin),
Arzneim.Forsch. 6, 596-598 (1956).

Gynaekologie

Peter Diehls:

"Der Abbau verschiedener Steroide durch Lebergewebe unter dem Einfluß von Lost- und Aethylenimin-Verbindungen."

Geb. am 16. Oktober 1935 in Kassel. Vorbildung: Volksschule

Steinwand bei Poppenhausen (Rhön), Reifeprüfung: 3. März 1956

Friedrichs-Gymnasium Kassel. Studiengang: Marburg 11 Semester, Hamburg 1 Semester.

Staatsexamen: 4. August 1962.

Promotion:

Referent: Prof. Dr. med. A. Würterle.

Correferent: Prof. Dr. med. Rm Buchholz.

Am Cortison-, Progesteron- und Östron-Stoffwechsel von Rattenleberschnitten wird der Einfluß verschiedener Cytostatika (Endoxan, Trenimon und TEM) geprüft.

Der Cortison- und Progesteron-Abbau wird durch Endoxan und Trenimon wesentlich stärker gehemmt, als der Östron-Abbau. TEM zeigte bei unseren Versuchen am Cortison- und Östron-Stoffwechsel keine Wirkung.

Die Wirkung der Cytostatika wird in einer unterschiedlichen Beeinflussung DPNH- und TPNH-abhängiger Reduktionen gesehen. Endoxan und Trenimon hemmen in hohem Maße die TPNH-abhängige Reduktion der Δ^4 -3-Ketogruppe des Cortisons sowie die ebenfalls TPNH-abhängige Reduktion der Δ^4 -3-Ketogruppe des Progesterons. Die DPNH-abhängige Reduktion der 17-Ketogruppe des Östrons wird dagegen nur wenig gehemmt. Mit großer Wahrscheinlichkeit wird die inaktive Transportform des Endoxans durch Lebergewebe enzymatisch aktiviert. Es scheint nur für die Zeit seiner Anwesenheit zu wirken. Parallelen zur Butazolidinwirkung auf den Cortisonstoffwechsel werden besprochen.

Für verschiedene Cytostatika sind verschiedene Angriffspunkte anzunehmen: In ihrer Beeinflussung maligner und normaler Gewebe bestehen quantitative und qualitative Unterschiede, die sich besonders in stoffwechselaktiven Geweben auswirken werden.

Am 16. 10. 1935 wurde ich als erster Sohn des Oberstabsarztes Dr. med. Otto Diehls und seiner Ehefrau Cornelia, geb. Diebel in Kassel geboren.

Nach einer vierjährigen Volksschulzeit in Kassel und infolge der Evakuierung in Steinwand bei Fulda, besuchte ich ab 1947 ein Jahr lang das Domgymnasium in Fulda. Bis zum Abitur im Jahre 1956 war ich Schüler des staatlichen Friedrichs-Gymnasiums in Kassel.

Mein vorklinisches Studium absolvierte ich in Marburg. Nach bestandenem Physikum im Jahre 1959 studierte ich ein Semester in Hamburg und kehrte wieder nach Marburg zurück. Dort legte ich im Jahre 1962 mein medizinisches Staatsexamen ab.

Seit Herbst des gleichen Jahres bin ich verheiratet. Meine zukünftigen Berufspläne gehen dahin, einmal als praktischer Arzt tätig zu sein.

Meine akademischen Lehrer waren die Herren Professoren und Dozenten:

in Marburg: Pirson, Dimroth, Seidel, Niessing, Petry, Walcher, Wendt, Mahr, Hensel, Bücher, Rollhäuser, Schmitz, Quecke, Schlegel, Bock, Gross, Lang, Hamm, Illig, Schwaiger, Huber, Würterle, Linzbach, Schmidt, Seiss, Hartmann, Linneweh, du Mesnil, Beckmann, Siegert, Heuser, Streicher, Heite, Förster, Hildebrandt, Meyer, Exner, Berendes, Jakob, Reichmann, von Manger König;

in Hamburg: Berg, Krauspe, Seelemann, Mallorny, Zuckschwerdt, Straub, Schäfer, Prevot.

